

СТАБИЛИЗАЦИЯ ЭКСПЛАНТОВ СОРТОВ ВИШНИ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Т.А. КРАСИНСКАЯ^{1,2}

¹РУП «Институт плодоводства»,
ул. Ковалева, 2, аг. Самохваловичи, Минский район, 223013, Беларусь

²МГЭИ им. А.Д. Сахарова БГУ,
ул. Долгобродская, 23, г. Минск, 220070, Беларусь,
e-mail: krasinskaya@tut.by

АННОТАЦИЯ

На примере сортов Ровесница, Любская, Ливенская, Волочаевка, Гриот Серидко, Заранка, Жывица, Уйфехертой фюртош показана зависимость от генотипа процессов регенерации эксплантов и геммагенеза растений-регенерантов в культуре *in vitro*. Использование 50%-ного раствора перекиси водорода экспозицией 10 мин для стерилизации почек в период начала роста растений (конец февраля – начало марта) эффективно для получения стерильных эксплантов. Для сортов Заранка, Жывица и Гриот Серидко среда для введения в культуру *in vitro* с ИМК (0,2 мг/л) и 6-БА (1 мг/л) оптимальна для регенерации эксплантов.

Влияние генотипа растений вишни прослеживалось на процессы геммагенеза. Минимальный показатель коэффициента размножения был отмечен у сортов Гриот Серидко и Заранка на модифицированной среде Мурасиге-Скуга с 1 мг/л 6-БА. Совместное применение цитокинина (6-БА) и ауксина (НУК) улучшало процесс геммагенеза сортов Жывица и Заранка, в результате чего коэффициент размножения увеличивался почти в 2 раза.

Ключевые слова: *Prunus cerasus*, гермоплазма, культура *in vitro*, этап инициации, Беларусь.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность использования культуры *in vitro* при получении оздоровленного посадочного материала сортов вишни и оптимизации ее протокола при размножении различных генотипов в пределах рода объясняется несколькими причинами:

1. Подвои и сорта рода *Prunus* L. после культуры *in vitro* обладают повышенной зимостойкостью и устойчивостью к грибным заболеваниям. Вегетативная масса деревьев у сортов, полученных через культуру *in vitro*, нарастает быстрее [1, 2], продуктивность черенкового маточника увеличивается в 1,5–2 раза [3]. Причем зеленые черенки растений, размноженных в условиях *in vitro*, обладают повышенной способностью к укоренению и лучшим развитием, в связи с чем уровень рентабельности оздоровленного черенкового маточника превышает этот показатель у обычного в среднем на 150 % [4]. Суперэлитные маточники позволили достичь высокого процента укоренения зеленых черенков (56–78 %) трудноукореняющихся сортов вишни (Тихоновская, Ровесница, Быстринка) [5].

Первое плодоношение сортов, полученных в условиях *in vitro*, отмечается уже на 1-й год цветения и в зависимости от сорта варьирует до 3 лет [1]. Урожайность на корнесобственных саженцах после культуры *in vitro* выше почти в 2 раза и характеризуется устойчивым постоянством [1, 2, 6, 7]. Помологические признаки плодов полностью сохраняются. Существенных различий по химическому составу плодов, привитых и корнесобственных меристемных сортов вишни, не выявлено. Канадские исследователи, изучая отличия корнесобственных растений сорта черешни Lambert после культуры *in vitro* и привитых на F12/1, отметили более светлую окраску и титруемую кислотность плодов вишни на растениях после культуры *in vitro*, что, вероятно, связано с более ранним их созревaniem на корнесобственных деревьях [7].

Продуктивность, устойчивость к абиотическим и биотическим стрессам корнесобственных сортов вишен в условиях Беларуси в полном объеме исследованы не были. И причина этого заключается в трудностях укоренения растений сортов традиционными методами (зелеными и одревесневшими черенками). На успех укоренения зелеными черенками оказывает влияние генотип: сорт Любская оказался слабоукореняемым сортом по сравнению с сортами Владимирская, Гриот московский и Шубинка [8].

2. Культура *in vitro* является одним из оптимальных вариантов обмена генетическим материалом при международном сотрудничестве, которая исключает передачу грибных и вирусных заболеваний плодовых и ягодных культур. Банк геноресурсов растений РУП «Институт плодоводства» постоянно пополняется новыми гермоплазмами из ближнего и дальнего зарубежья.

3. Оптимизация условий культивирования растений рода *Prunus* L. в условиях *in vitro* позволяет сохранять и эффективно размножать материал как источник ценных хозяйственно-биологических признаков, необходимых для селекционного процесса.

Цель работы – изучить особенности развития эксплантов сортов вишни на этапе введения в культуру *in vitro* и на первом пассаже этапа микроразмножения в зависимости от их генотипа.

МЕТОДИКА И МАТЕРИАЛЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проведены в отделе биотехнологии РУП «Институт плодоводства». Объекты исследований: сорта вишни (*Prunus cerasus*) российской селекции – Ровесница, Любская, Ливенская, Волочаевка, Гриот Серидко; сорта белорусской селекции – Заранка, Жывица (черешне-вишневый гибрид); сорт венгерской селекции – Уйфехертой фюртош.

Этап введения в культуру *in vitro*. Экспланты – верхушечные и пазушные почки без кроющих чешуй.

Почки перед стерилизацией срезали лезвием с одревесневших черенков, которые заготавливали в период покоя растений и хранили при +4 °С до конца февраля. Введение в культуру проводили в период с конца февраля – начала марта.

Схема стерилизации эксплантов: промывка черенков под проточной водой; 0,2%-ный раствор бенлата – 75 мин; в ламинарном боксе: 70%-ный раствор спирта – 1 мин, 50%-ный раствор перекиси водорода – 10 мин, трехкратная промывка стерильной дистиллированной водой – по 10 мин.

Питательная среда для введения эксплантов в культуру *in vitro*: модифицированная среда Мурасиге-Скуга (MS) – макро- и микросоли по прописи среды MS, витамины B1, B6, PP – 0,5 мг/л, витамин C – 1 мг/л, ИМК – 0,2 мг/л, 6-БА – 1 мг/л, pH – 5,6–5,7.

Длительность субкультивирования – 30 дней.

Этап микроразмножения. Использовали несколько модифицированных агаризованных питательных сред MS:

Среда 1: макро- и микросоли по прописи среды MS, витамины B1, B6, PP – 0,5 мг/л, витамин C – 1 мг/л, 6-БА – 1 мг/л, гибберелловая кислота (ГК) – 2 мг/л, pH – 5,6–5,7.

Среда 2: макро- и микросоли по прописи среды MS, витамины B1, B6 – 0,8 мг/л, витамин PP – 1 мг/л, 6-БА – 1,1 мг/л, нафтилуксусная кислота (НУК) – 0,09 мг/л, pH – 5,6–5,7.

Длительность субкультивирования – 37–40 дней.

Показатель «коэффициент размножения» – среднее количество растений на конгломерат.

Условия культивирования растений на этапах введения и микроразмножения: освещение (лампы Phillips ЛД-54, 36W) – 2,5–3 тыс. лк, температура – +21...+23 °С, фотопериод – 16/8 ч.

Статистическую обработку проводили в программе STATISTICA 10.0, используя ANOVA однофакторный и двухфакторный анализ в зависимости от эксперимента, критерий Дункана для сравнения средних величин при P = 0,95. Одинаковые буквенные значения в столбцах означают недостоверность различий между средними значениями. В таблице данные отображены в виде: среднее значение ± средняя статистическая ошибка.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Этап введения. В результате однофакторного анализа полученных результатов с высокой степенью достоверности можно утверждать, что успех инициации эксплантов сортов вишни в культуру *in vitro* определялся генотипом растений ($p < 0,001$). Использование 50%-ного раствора перекиси водорода в качестве основного стерилизующего агента показало свою эффективность: доля инфицированных эксплантов варьировала от 0 до $31,2 \pm 2,69$ % в зависимости от генотипа, некротизации при этом не отмечалось (таблица 1). Экспланты сорта Волочаевка характеризовались максимальной долей инфицированности – 31,2 %, экспланты сортов Жывица и Заранка не содержали в культуре *in vitro* ни бактериальной, ни грибной инфекции. В предыдущих наших исследованиях в качестве стерилизующих агентов использовались ртутьсодержащие соединения: 0,1%-ный раствор сулемы и 0,01%-ный раствор мертиолат. Оба вещества относятся к первой группе опасности для живых организмов и окружающей среды, в том числе и для человека, но используются в культуре различных тканей и клеток для элиминации бактериальной и грибной инфекции [9, 10]. В зависимости от формы или сорта рода *Prunus* L. сулема вызывала до 100 % некроза, что негативно сказывалось на эффективности работы [11, 12].

Таблица 1 – Развитие эксплантов сортов вишни на этапе введения в культуру *in vitro*

Сорт (Фактор А)	Доля инфицированных эксплантов, %	Доля не развивающихся эксплантов, %	Доля нормально развитых эксплантов, %	Коэффициент размножения
Ливенская	$17,4 \pm 2,00^b$	$37,6 \pm 0,93^c$	$45,1 \pm 1,10^a$	$1,23 \pm 0,041^b$
Уйфехертой фюртош	$15,0 \pm 0,37^b$	$47,5 \pm 1,27^a$	$37,6 \pm 0,93^a$	$1,1 \pm 0,07^{ab}$
Волочаевка	$31,2 \pm 2,69^d$	$24,9 \pm 2,43^b$	$43,9 \pm 4,00^a$	$1,23 \pm 0,031^b$
Ровесница	$12,5 \pm 2,40^{ab}$	$32,4 \pm 1,63^d$	$55,1 \pm 3,38^d$	$1,0 \pm 0^a$
Любская	$6,7 \pm 0,00^a$	$48,9 \pm 2,20^a$	$44,5 \pm 2,23^a$	$1,0 \pm 0^a$
Гриот Серидко	$8,3 \pm 4,17^a$	$0,0^c$	$91,7 \pm 4,17^c$	$1,0 \pm 0^a$
Жывица	$0,0^c$	$0,0^c$	$100,0 \pm 0,00^b$	$2,3 \pm 0,11^c$
Заранка	$0,0^c$	$0,0^c$	$100,0 \pm 0,00^b$	$1,2 \pm 0,09^{ab}$

При введении в культуру отмечалось наличие эксплантов, которые не развивались на питательной среде в микрорастения: доля не развившихся эксплантов зависела от сорта и варьировала от 0 (Гриот Серидко, Жывица, Заранка) до $48,9 \pm 2,20$ % (сорт Любская). В результате исследований наименьшее количество стерильных и жизнеспособных эксплантов было получено у сортов Уйфехертой фюртош, Ливенская, Волочаевка и Любская, максимальное – у сортов Заранка и Жывица (100 %).

Использование в качестве эксплантов очищенных от кроющих чешуй почек способствовало получению у сортов Ливенская, Уйфехертой фюртош, Волочаевка, Жывица, Заранка конгломератов уже на этапе введения: экспланты сорта Жывица проявили большую отзывчивость на гормональный состав среды для введения, коэффициент размножения составил 2,3.

Этап микроразмножения. На первом пассаже этапа микроразмножения продолжалась потеря эксплантов, но анализ результатов не позволил утверждать, что данный процесс был обусловлен генотипом растений. Максимальная потеря растений-регенерантов отмечалась у сорта Жывица и к концу первого пассажа жизнеспособными оказались только 75,6 % посаженных растений (таблица 2). Статистическая обработка данных (однофакторный анализ) не выявила зависимости потери эксплантов на первом пассаже от генотипа растений.

Коэффициент размножения как показатель эффективности процесса геммагенеза на среде с 1 мг/л 6-БА и 2 мг/л ГК максимальным был у сорта Уйфехертой фюртош ($5,4 \pm 0,07$) ($p < 0,001$). Во вторую группу по активности развития пазушных меристем можно отнести сорта Ливенская, Волочаевка, Любская (коэффициент размножения варьировал от 2,5 до 2,9), к третьей группе – сорта Жывица и Ровесница (коэффициент размножения – 1,7 и 1,9), четвертая – сорта Гриот Серидко и Заранка (коэффициент размножения – 1,1 и 1,2 соответственно).

Таблица 2 – Морфогенез растений-регенерантов на первом пассаже микроразмножения на модифицированной среде Мурасиге-Скуга с 1 мг/л 6-БА и 2 мг/л ГК (Среда 1)

Сорт (Фактор А)	Доля развивающихся экплантов, %	Коэффициент размножения
Ливенская	100,0±0,00 ^b	2,5±0,09 ^a
Уйфехертой фюртош	91,7±8,33 ^{ab}	5,4±0,07 ^d
Волочаевка	91,7±8,33 ^{ab}	2,7±0,20 ^a
Ровесница	88,9±5,57 ^{ab}	1,9±0,07 ^c
Любская	100,0±0,00 ^b	2,5±0,09 ^a
Гриот Серидко	83,3±8,33 ^{ab}	1,1±0,11 ^b
Жывица	75,6±4,43 ^a	1,7±0,05 ^c
Заранка	100,0±0,00 ^b	1,2±0,09 ^b

На примере сортов Гриот Серидко, Жывица и Заранка изучили совместное влияние ауксина и цитокинина в среде на процесс геммагенеза. В ходе работы было отмечено, что 6-БА в концентрации 1,1 мг/л и НУК (0,09 мг/л) улучшают процесс развития пазушных меристем у сорта Жывица и Заранка, коэффициент размножения которых достигал значения 3,0 и 2,0 (таблица 3).

Увеличение способности установлено в ряду сортов: Гриот Серидко, Заранка, Жывица. Последний сорт активность в процессе закладки и росте пазушных меристем проявлял на этапе введения в культуру *in vitro*.

Таблица 3 – Коэффициент размножения растений-регенерантов на питательных средах

Сорт (Фактор А)	Питательная среда (Фактор В)		
	Среда 1 (контроль)	Среда 2	Среднее по сортам
Гриот Серидко	1,1±0,11 ^a	1,1±0,08 ^a	1,1±0,06
Жывица	1,7±0,05 ^{ab}	3,0±0,00 ^c	2,4±0,29
Заранка	1,2±0,09 ^a	2,0±0,58 ^b	1,6±0,32
Среднее по средам	1,3±0,10	2,0±0,32	—

Таким образом, на первых этапах клонального микроразмножения сортов вишни четко прослеживается зависимость развития экплантов и растений-регенерантов от генотипа. В связи с чем для успешного и эффективного процесса введения в культуру *in vitro* сортов вишни рекомендуется разработка и оптимизация протоколов клонального микроразмножения с учетом сортовых особенностей.

ВЫВОДЫ

1. Эффективность этапа введения в культуру *in vitro* с высокой степенью достоверности обусловлена генотипом сортов вишни. Использование 50%-ного раствора перекиси водорода экспозицией 10 мин в качестве основного стерилизующего агента в период начала роста растений эффективен для получения стерильного и жизнеспособного растительного материала. Для сортов Заранка, Жывица, Гриот Серидко среда для введения в культуру *in vitro* с ИМК (0,2 мг/л) и 6-БА (1 мг/л) оптимальна для развития экплантов.

2. Отмечено влияние генотипа растений вишни на процессы геммагенеза ($p < 0,001$). Минимальный показатель коэффициента размножения был отмечен у сортов Гриот Серидко и Заранка на среде с 1 мг/л 6-БА. Совместное применение цитокинина (6-БА) и ауксина (НУК) улучшают процесс геммагенеза сортов Жывица и Заранка, в результате чего коэффициент размножения увеличивается почти в 2 раза.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Методические рекомендации по использованию биотехнологических методов в работе с плодовыми, ягодными и декоративными культурами / Е.Н. Джигаadlo, М.И. Джигаadlo, Л.В. Голышкина; под ред. М.И. Джигаadlo. – Орел: ГНУ ВНИИСПК, 2005. – 51 с.
2. Klaas, L. Comparative assessment of growth and cropping of sour cherry trees grafted on «Mahaleb» seedlings or own-rooted from *in vitro* propagation / L. Klaas, H. Jänes, K. Kahu // *Acta Hortic.* – 2008. – № 795. – P. 435–438.
3. Еремин, Г.В. Продуктивность суперэлитного черенкового маточника подвоев косточковых культур / Г.В. Еремин, В.П. Подорожный, А.В. Проворченко // *Садоводство и виноградарство.* – 1995. – № 4. – С. 14–15.
4. Подорожный, В.П. Ускоренное внедрение в производство алычи и новых клоновых подвоев косточковых культур с использованием биотехнологических методов / В.П. Подорожный // *Совершенствование сортимента и технологии возделывания косточковых культур: материалы науч.-метод. конф., Орел, 14–17 июля 1998 г.* / Рос. акад. с/х наук, Всерос. науч.-исслед. ин-т селекции плодовых культур; редкол.: В.С. Докукин (отв. ред.) [и др.]. – Орел, 1998. – С. 182–184.
5. Микроразмножение и производство посадочного материала плодовых и ягодных культур высших категорий качества / М.И. Джигаadlo [и др.] // *The Biology of plant cells in vitro and biotechnology: материалы VIII Междунар. конф., Саратов, 9–13 сент. 2003 г.* / Рос. акад. наук, Ин-т физиологии раст. им. К.А. Тимирязева, Ин-т биохимии и физиологии раст. и микроорганизм., Саратовский гос. ун-т, Об-во физиологов раст. России; редкол.: А.М. Носов [и др.]. – Саратов, 2003. – С. 109.
6. Карычев, К.Г. Корнесобственные деревья сливы (из *in vitro*) в саду / К.Г. Карычев, А.И. Янкова // *Садоводство и виноградарство.* – 2004. – № 1. – С. 11–12.
7. Quamme, H.A. Early performance of micropropagated trees of several malus and prunus cultivars on their own roots / H.A. Quamme, R.T. Brownlee // *Canad. J. Plant Sc.*, 1993 – Vol. 73, № 3. – P. 847–855.
8. Шарафутдинов, Х.В. Особенности получения корнесобственных саженцев вишни и черешни методом зеленого черенкования / Х.В. Шарафутдинов // *Известия ТСХА.* – 2006. – Вып. 4 – С. 68–75.
9. Sedlak, J. *In vitro* propagation of the P-HL dwarfing sweet cherry rootstocks / J. Sedlak, F. Paprstein, M. Erbenova // *Acta Hortic.* – 2008. – 795. – P. 395–400.
10. Badoni, A. *In vitro* sterilization protocol for micropropagation of Solanum tuberosum cv. 'Kufri Himalini' / A. Badoni, J. S. Chauhan // *Academia Arena.* – 2010. – 2 (4). – P. 24–27.
11. Красинская, Т.А. Микроразмножение различных форм *Cerasus* Mill. *in vitro* / Т.А. Красинская, Н.В. Кухарчик // *Плодоводство: науч. тр. / Ин-т плододства Нац. акад. наук Беларуси; редкол.: В.А. Матвеев (гл. ред.) [и др.]. – Самохваловичи, 2004. – Т. 16. – С. 26–31.*
12. Красинская, Т.А. Влияние стерилизующих агентов и гормонального состава сред на развитие эксплантов подвоев рода *Cerasus* Mill. на этапе введения в культуру *in vitro* / Т.А. Красинская // *Молодые ученые – возрождению агропромышленного комплекса России: материалы Междунар. науч.-практ. конф. молодых ученых, Брянск, 23–24 мая, 2006 г.* / ФГОУ ВПО «Брянская госуд. с/х акад.»; под ред. В.В. Соболева. – Брянск, 2006. – С. 24–26.

IN VITRO CULTURE STABILIZATION OF SOUR CHERRY EXPLANTS

T.A. KRASINSKAYA

Summary

The dependence of explant regeneration and gemmagenesis *in vitro* on genotype was noted using sour cherry cultivars Rovesnitsa, L'ubskaya, Livenskaya, Volochaevka, Griot Seridko, Zaranka, Zhivitsa and Üjfehértói Fürtös. 50 % hydrogen peroxide at the exposition of 10 min for bud sterilization at the beginning of active plant growth (the end of February - early March) is effective for getting of aseptic explants. The nutrition medium for initiation *in vitro* culture with IBA (0.2 mg/l) and 6-BA (1 mg/l) is optimal for explant regeneration for cv. Zaranka, Zhivitsa and Griot Seridko.

The influence of sour cherry genotype was noted on gemmagenesis. The minimum of the multiplication rate was observed on the modified Murashige-Skooga medium with 1 mg/l of 6-BA for cv. Griot Seridko and Zaranka. The combined use of cytokinin (6-BA) and auxin (NAA) improved the gemmagenesis of the cv. Zhivitsa and Zaranka, as a result of which the multiplication rate almost doubled.

Keywords: *Prunus cerasus*, germplasm, culture *in vitro*, initiation stage, Belarus.

Дата поступления статьи в редакцию 19.05.2017